



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**PŘÍPRAVA DNA S LOKÁLNÍMI STRUKTURAMI**

PREPARATION OF DNA WITH LOCAL DNA STRUCTURES

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Ellen Lofítková

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

**BRNO 2019**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1231/2017  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Ellen Lofítková**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**  
Akademický rok: 2018/19

### Název bakalářské práce:

Příprava DNA s lokálními strukturami

### Zadání bakalářské práce:

Literární rešerše, in silico analýza lokálních struktur, izolace DNA a jejich charakterizace.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Ellen Lofítková  
student(ka)

-----  
doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

V práci jsem se soustředila na kvadruplexy a křížové struktury DNA. Byly zkoumány plazmidy pBluescript a od něj odvozené vložením oligonukleotidové sekvence. *In silico* analýzou v QGRS Mapper a Palindrome analyser byly vyhledány sekvence tvořící kvadruplexy a křížové struktury. Plazmidy byly transformovány do *E. coli*, izolovány a poté podrobeny štěpení enzymy S1 nukleázou a restriční endonukleázou ScaI. Rozštěpení S1 nukleázou vypovídalo o přítomnosti lokální struktury. Kombinované štěpení S1/ScaI nepřineslo přesvědčivé výsledky kvůli ztrátě DNA při přečištění.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

DNA, kvadruplex, křížová struktura

## **ABSTRACT**

In this thesis I focused on quadruplexes and cruciforms formed by DNA. Plasmids pBluescript and others derived from it by inserting oligonucleotid sequences were studied. Sequences forming quadruplexes and cruciforms were found by *in silico* analysis by QGRS Mapper and Palindrome analyser. Plasmids were transformed into *E. coli*, isolated and then cleaved with enzymes S1 nuclease and restriction endonuclease ScaI. Cleaving with S1 nuclease predicated presence of local structure. Combined S1/ScaI cleavage did not bring satisfying results due to lost of DNA during purification.

## **KEYWORDS**

DNA, quadruplex, cruciform

LOFÍTKOVÁ, Ellen. *Příprava DNA s lokálními strukturami*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/108287>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Václav Brázda.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studentky

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala doc. Mgr. Václavu Brázdovi Ph.D. za vedení mé práce a veškeré konzultace. Mé díky patří také Ing. Barboře Tomanové za čas strávený se mnou v laboratoři a praktické rady. Děkuji své rodině a přátelům za jejich podporu materiální, psychickou i modlitební.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Struktura DNA .....	8
2.1.1	Primární struktura .....	8
2.1.2	Sekundární struktura .....	8
2.1.3	Terciární struktura .....	9
2.1.4	Kvartérní struktura.....	9
2.1.5	Párování bází .....	9
2.1.6	Lokální struktury DNA.....	10
2.2	Analýza výskytu kvadruplexů a křížových struktur .....	11
2.2.1	<i>In silico</i> analýza .....	11
2.2.2	Štěpení enzymy.....	13
2.3	Plazmidy .....	13
2.4	Gelová elektroforéza DNA .....	14
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	15
3.1	Materiál .....	15
3.1.1	Chemikálie.....	15
3.1.2	Roztoky a pufrы .....	15
3.1.3	Pomůcky a přístroje .....	16
3.1.4	Bakteriální kmen.....	16
3.1.5	Plazmidy .....	16
3.1.6	Enzymy pro štěpení .....	16
3.2	Metody .....	17
3.2.1	<i>In silico</i> analýza výskytu kvadruplexů a křížových struktur .....	17
3.2.2	Příprava kompetentních buněk .....	17
3.2.3	Transformace plazmidové DNA do kompetentních buněk .....	17
3.2.4	Kultivace bakteriálních buněk .....	17
3.2.5	Izolace plazmidové DNA .....	17
3.2.6	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty plazmidové DNA .....	18
3.2.7	Agarózová gelová elektroforéza plazmidové DNA.....	18
3.2.8	Štěpení plazmidové DNA .....	18
3.2.9	Agarózová gelová elektroforéza produktů štěpení .....	19

3.3	Výsledky a diskuze .....	19
3.3.1	<i>In silico</i> analýza výskytu kvadruplexů a křížových struktur .....	19
s3.3.3	Izolace plazmidové DNA .....	23
3.3.4	Štěpení plazmidové DNA .....	24
4	ZÁVĚR.....	27
5	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	28
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	31

# 1 ÚVOD

Deoxyribonukleová kyselina je biomakromolekula nesoucí genetickou informaci. Její struktura je popisována na několika úrovních. Velmi důležité jsou tzv. lokální struktury, mezi které patří kvadrupelexy, triplexy, křížové struktury, vlásenky a T-smyčky. Tato práce se zaměřuje na dvě z těchto struktur, kvadrupelexy a křížové struktury.

DNA podléhá procesům replikace, transkripce a translace. Regulace těchto procesů probíhá díky interakci s různými signálními molekulami, enzymy a proteiny. K interakci dochází mnohdy právě v místech, kde se tvoří lokální struktury. Studium a pochopení souvislostí mezi strukturou DNA a konkrétními interakcemi slouží k vývoji léčiv pro řadu nemocí.

Cílem této bakalářské práce bylo analyzovat konkrétní sekvence DNA na přítomnost kvadrupelexů a křížových struktur. Bylo vybráno 16 sekvencí inzertovaných do plazmidu pBluescript. První část analýzy proběhla *in silico* pomocí webových aplikací QGRS Mapper a Palindrome analyser. Dále byly plazmidy pBluescript a od něj odvozené transformovány do buněk bakterie *E. coli* a plazmidová DNA z nich izolována. Následovalo štěpení enzymy S1 nukleázou a restrikční endonukleázou ScaI.

*In silico* analýzou byly nalezeny sekvence s potenciálem tvorby kvadrupelexů a křížových struktur. Enzym S1 nukleáza rozštěpil superhelikální DNA v místě ssDNA (smyčka kvadrupelexů a křížových struktur) a vznikla lineární molekula. Kombinované štěpení S1/ScaI se nezdařilo kvůli purifikaci.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Struktura DNA

Deoxyribonukleová kyselina, z angličtiny označovaná jako DNA (deoxyribonucleic acid), obsahuje genetickou informaci a je základem dědičnosti [1]. Jedná se o polynukleotid, složený ze čtyř různých deoxyribonukleotidů [2]. Struktura DNA je běžně popisována na čtyřech úrovních: primární, sekundární, terciární a kvartérní struktura [3].

Základní stavební jednotkou nukleových kyselin jsou nukleotidy. Obsahují cukernou složku, v případě DNA se jedná o 2'-deoxy- $\beta$ -D-ribózu, dále dusíkatou bázi a kyselinu fosforečnou. Dusíkaté báze se v molekule DNA vyskytují převážně čtyři, pyrimidinové báze thymin (T) a cytosin (C), purinové báze adenin (A) a guanin (G) [2]. V menším množství se objevují i jiné, tzv. minoritní báze, jako třeba 5-methylcytosin [4].

#### 2.1.1 Primární struktura

Pokud hovoříme o primární struktuře DNA, zajímá nás pořadí nukleotidů v řetězci [3]. Sekvence je označována písmeny podle bází A, T, G, C [1]. Nukleotidy polymerují kondenzací za odštěpení vody. Vazba je tvořena mezi hydroxylem na C3'-uhlíku deoxyribózy jednoho nukleotidu a hydroxylem kyseliny fosforečné na C5'-uhlíku druhého nukleotidu. Vzniká tak 3', 5'-fosfodiesterová vazba a dva konce označované jako 3'-konec a 5'-konec. Tato vazba spojující nukleotidy se nazývá „páteř“ polynukleotidu [3].

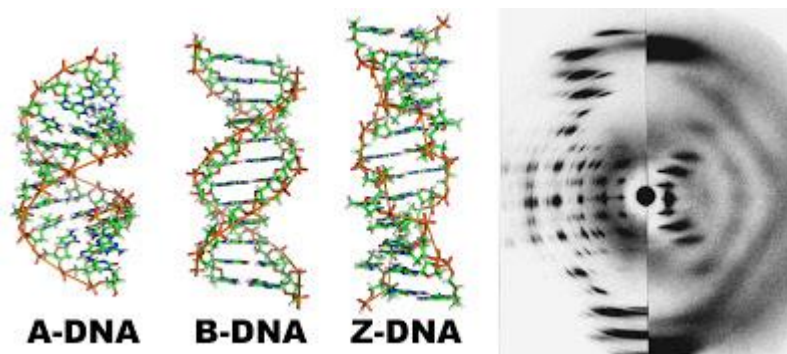
Molekula DNA neobsahuje stejné množství všech čtyř bází, ale platí Chargaffova pravidla, že molový obsah adeninu je stejný jako molový obsah thyminu, a podobně molový obsah guaninu se rovná molovému obsahu cytosinu [4].

#### 2.1.2 Sekundární struktura

Popis sekundární struktury DNA patří mezi nejvýznamnější objevy 20. století. Učinili ho Watson a Crick v roce 1953 v návaznosti na rentgenovou analýzu provedenou Franklinovou a Wilkinsonem [5]. Zjistili, že molekula DNA má tvar dvojité pravotočivé dvoušroubovice, jinak také dvojitého helixu, tvořeného dvěma antiparalelními nukleotidovými řetězci. Dvouřetězcová DNA, dsDNA (z angl. double-stranded), byla experimentálně prokázána téměř ve všech případech, s výjimkou některých fágů, ve kterých se nachází jednořetězcová DNA, ssDNA (single-stranded) [4]. Řetězce jsou navzájem komplementární. Komplementarita bází je jejich schopnost se párovat, a to vždy dvojice adenin-thymin, cytosin-guanin. V jednom závitě dvoušroubovice se nachází asi 10,5 párů bází (bp), což je úsek o délce 3,4 nm. Vnější část dvoušroubovice je tvořena páteří, báze jsou orientovány směrem dovnitř. Tak mezi nimi mohou vznikat vodíkové můstky podílející se na stabilitě molekuly [3].

Geometricky může být pravotočivá dvoušroubovice uspořádána dvěma různými způsoby. U typu B jsou páry bází téměř kolmé na osu dvoušroubovice, u typu A je úhel jiný. Ve vodném prostředí je stabilnější B-forma, což vede k předpokladu, že nativní DNA se vyskytuje převážně ve formě B-DNA. Některé úseky molekuly však mohou mít jinou strukturu, levotočivou zubovitou formu označovanou písmenem Z [4]. Struktury DNA forem A, B a Z jsou znázorněny na obrázku 1.





Obrázek 1: Formy DNA; vlevo: struktura DNA A-, B- a Z-forma; vpravo: rentgenové snímky DNA, levá část A-DNA, pravá část B-DNA [6]

### 2.1.3 Terciární struktura

Terciární struktura DNA se vytvoří, jestliže se dvoušroubovice smotá nadšroubovicovým vinutím do superhelixu (nadšroubovice). Toto vinutí může být kladné nebo záporné. Nesvinutá molekula dsDNA je ve formě lineární či relaxované kružnice [3].

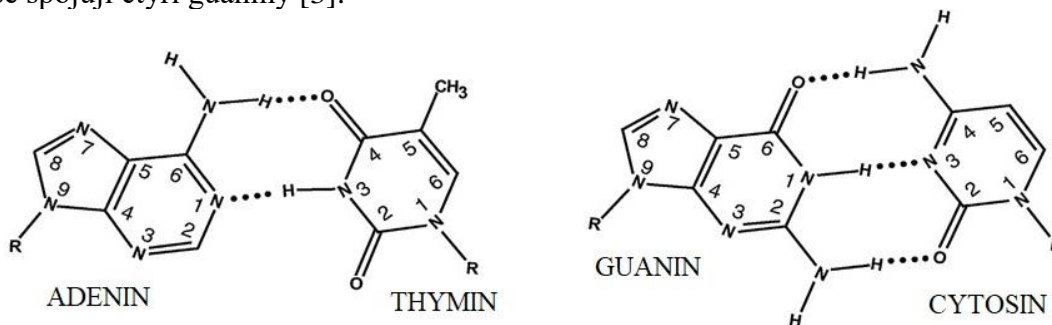
### 2.1.4 Kvartérní struktura

Kvartérní struktura se vyskytuje u eukaryot, kde DNA interaguje s proteiny (histony). Tvoří se nukleozómy, které se splétají do solenoidů a posléze vytvářejí chromozómy [3] [7].

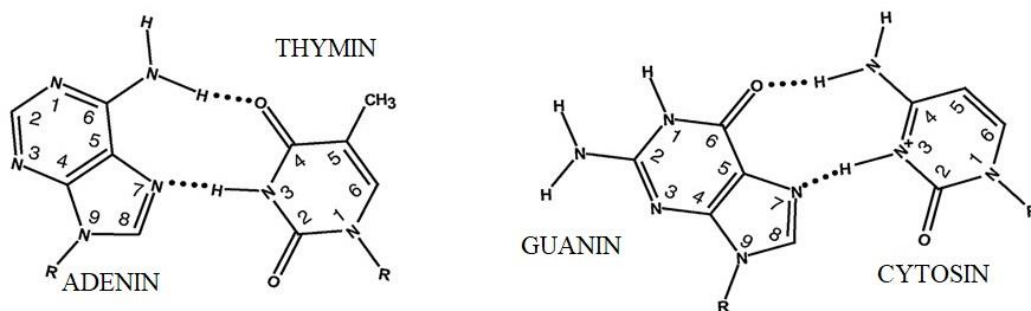
### 2.1.5 Párování bází

Základní párování bází probíhá podle Watsonova-Crickova pravidla. Adenin s thyminem se párují dvěma vodíkovými vazbami, guanin s cytosinem třemi, viz obrázek 2.

Hoogsteenovo párování bází (obrázek 3) objasňuje vznik triád (triplexů) a tetrád (kvadruplexů). Podstatou triplexů je to, že purinové báze mohou tvořit Watsonův-Crickův pár na jedné straně a Hoogsteenův pár na straně druhé. Kvadruplexy, jak už název napovídá, se skládají ze čtyř bází. Nejčastěji jsou kvadruplexy v G-bohatých oblastech, tzv. G-kvadruplexy, kdy se spojují čtyři guaniny [3].



Obrázek 2: Watsonovo-Crickovo párování bází; upraveno podle [8]



Obrázek 3: Hoogsteenovo párování bází; upraveno podle [8]

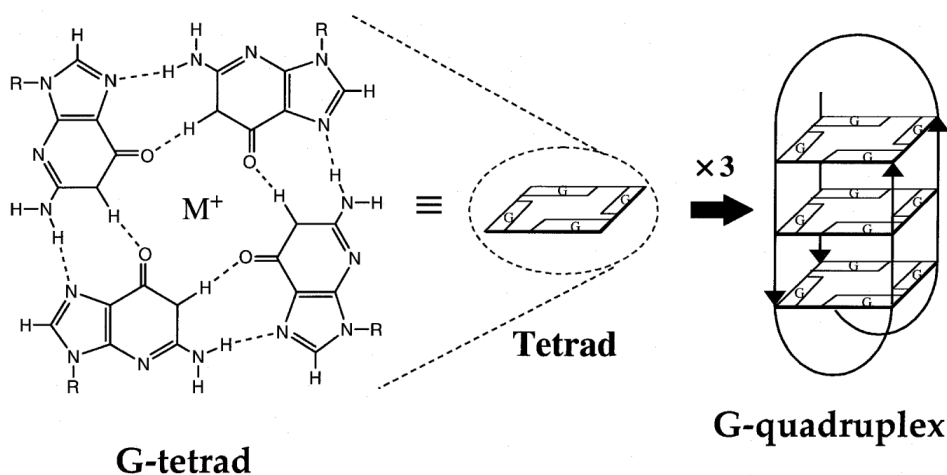
### 2.1.6 Lokální struktury DNA

Jak už bylo nastíněno v kapitole 2.1.2, součástí molekuly B-DNA jsou struktury, které se vymykají klasickému dvojitému helixu. Tyto tzv. lokální struktury jsou v genomech všech organismů běžné a hrají kritickou roli v regulaci mnoha základních biologických funkcí. Nejlépe popsány jsou křížové struktury, levotočivá Z-DNA, triplexy a kvadruplexy [9].

#### 2.1.6.1 G-kvadruplexy

G-kvadruplexy (dále jen „kvadruplexy“) jsou tvořeny opakovaným ohýbáním nukleotidového řetězce DNA či RNA (ribonukleová kyselina) [10]. Základním motivem jsou G-tetrády, čtveřice guaninových bází planárně spojených vodíkovými vazbami (Hoogsteenovo párování), které se skládají na sebe, viz obrázek 4. Guaniny mohou být součástí pouze jednoho vlákna, pak se jedná o intramolekulární kvadruplex. Intermolekulární kvadruplexy jsou tvořeny dvěma nebo čtyřmi vlákny [11].

Kvadruplex může být vytvořen již ze dvou tetrád, ovšem struktury se třemi a více tetrádami jsou považovány za stabilnější [12]. V ohybech vlákna DNA vznikají tzv. smyčky obsahující libovolné nukleotidy [11]. Uprostřed tetrády kvadruplexu se může vyskytovat jednomocný kation, který slouží ke stabilizaci struktury [13].

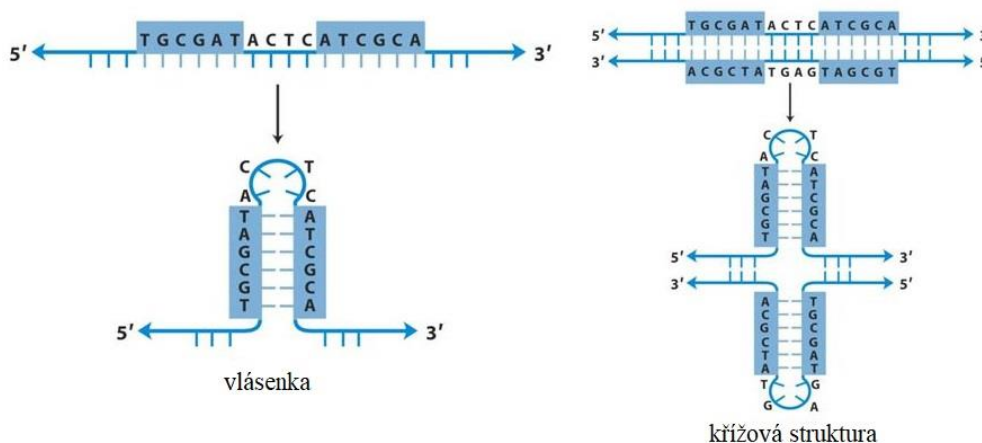


Obrázek 4: G-tetráda spojená Hoogsteenovými vodíkovými vazbami, G-kvadruplex [14]

#### 2.1.6.2 Křížové struktury

Křížové struktury vznikají z obrácených (inverzních) repetit. Jestliže je obrácená repetice bez mezery je označována jako palindrom. Inverzní repetice jsou úseky DNA, ve kterých je sekvence nukleotidů stejná při čtení zepředu i zezadu. Z těchto sekvencí se tvoří vlásenky nebo

křížové struktury (obrázek 5) tak, že nukleotidy se párují na jednom vlákně mezi sebou. Vlásenky vznikají pouze na jednom z komplementárních řetězců. Křížové struktury se tvoří na obou řetězcích. Pokud spolu inverzní repetice bezprostředně nesousedí, vznikají vlásenky a křížové struktury se smyčkou [3]. Křížové struktury se mohou vytvořit z inverzní repetice o délce alespoň 6 nukleotidů [9].



Obrázek 5: Vlásenka a křížová struktura se smyčkou; upraveno podle [15]

### 2.1.6.3 Význam kvadruplexů a křížových struktur

Kvadruplexy a křížové struktury nalezneme v DNA a RNA prokaryot i eukaryot. Bylo prokázáno, že hrají důležitou roli v procesech jako replikace, transkripce a methylace. [16].

Kvadruplexy jsou často spojovány s telomerními oblastmi lidského genomu, jež se skládají převážně z guaninů [11]. Jeden z prvních popsanych kvadruplexů byl nalezen v telomerní oblasti [9]. Tvorba kvadruplexů je regulována pomocí proteinů, některé strukturu stabilizují, jiné destabilizují. Proteiny, které stabilizují kvadruplexy v telomerní oblasti, tak mohou inhibovat aktivitu telomeráz a tudíž působit inhibičně u nádorových onemocnění se zvýšenou aktivitou telomeráz [13].

Mnoho proteinů interagujících s DNA vykazuje silnou preferenci vazby ke kvadruplexům a křížovým strukturám oproti vazbě k B-DNA se stejnou sekvencí. Mezi ně patří protein p53, který je velmi důležitý pro regulaci buněčného cyklu a je velmi často mutovaný u nádorových onemocnění [9]. Dalším takovým proteinem je BRCA1, nádorový supresor [17]. Protein IFI16, který se chová jako senzor virů a bakterií a je důležitý pro imunitní reakci, má zvýšenou afinitu ke struktuře kvadruplexu [18].

## 2.2 Analýza výskytu kvadruplexů a křížových struktur

### 2.2.1 In silico analýza

#### 2.2.1.1 QGRS Mapper

QGRS Mapper (Quadruplex forming G-Rich Sequences) je webový server, který předpovídá tvorbu kvadruplexů v nukleotidových sekvencích bohatých na guanin. Aplikace je uživatelsky přívětivá a volně přístupná. Poskytuje více způsobů, jak definovat a studovat kvadruplexy. Je schopná analyzovat DNA i RNA, sekvence genomů, např. promotory a telomerní oblasti. Je vhodná také ke studiu oligonukleotidů [12].

Nukleotidová sekvence může být vložena uživatelem v textové podobě nebo ve formátu fasta. Program nabízí i možnost vyhledat požadovanou sekvenci v databázi NCBI podle genového ID, názvu či symbolu a dalších parametrů. Kromě sekvence lze definovat vyhledávací kritéria: délku sekvence tvořící kvadruplex (QGRS), minimální počet guaninů ve skupině, velikost a složení smyčky [12].

Předpokládané kvadruplexy jsou identifikovány podle následujících měřítek. Motiv se skládá ze čtyř stejně dlouhých sad guaninů, nazvaných G-skupiny, oddělených libovolnými nukleotidy. G-skupina musí obsahovat alespoň 2 guaniny, nejvýše 6. Obvyklé nastavení délky QGRS je maximálně 30 bází, ovšem aplikace umožňuje nastavení až na 45. Mezery nebo také smyčky mezi G-skupinami mohou být libovolně dlouhé, omezené jsou maximální délkou celé sekvence [12].

Výsledek analýzy v QGRS Mapper zahrnuje délku sekvence, počet úseků sekvence, které mohou tvořit kvadruplex. Pod záložkou „data view“ (tj. přehled dat) je u každého kvadruplexu uvedena pozice v sekvenci, délka a G-skóre, viz obrázek 6 [12].

Pro tuto aplikaci byl vyvinut systém, který hodnotí pravděpodobnost tvorby stabilního kvadruplexu. Číslo je označeno jako G-skóre. Čím vyšší je hodnota G-skóre, tím stabilnější kvadruplex bude. Maximální hodnota závisí na nastavení délky sekvence tvořící kvadruplex, např. při horní hranici 30 může G-skóre nabýt maximální hodnoty 105 [12].

Position	Length	QGRS	G-Score
32	14	<a href="#">GGCGGGTGTGGTGG</a>	19
489	21	<a href="#">GGGAAGGGCGATCGGTGCGGG</a>	20
532	25	<a href="#">GGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGG</a>	11
652	30	<a href="#">GGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTGACGG</a>	15
695	27	<a href="#">GGGGGGCTTTTTTCGGGGGGCGGGGGG</a>	34
1026	12	<a href="#">GGGGAGAGGCGG</a>	18
1089	23	<a href="#">GGTCGTTCTGGCTGCGGCGAGCGG</a>	19
1128	30	<a href="#">GGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGG</a>	7
1601	28	<a href="#">GGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGG</a>	9
1649	29	<a href="#">GGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGG</a>	11
1747	29	<a href="#">GGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGG</a>	6

Obrázek 6: Přehled dat (data view) v aplikaci QGRS Mapper

### 2.2.1.2 Palindrome analyser

Webová aplikace Palindrome analyser byla vytvořena za účelem vyhledávání inverzních repetit v nukleotidových sekvencích podle tří základních parametrů: délky inverzní repetice, délky smyčky (mezery) mezi inverzními repeticemi a počtem neshod v inverzní repetici [16].

Palindrome analyser je volně dostupný. Uživatel může vložit analyzovanou sekvenci jako text, ve fasta formátu, nebo využít propojení programu s databází NCBI a najít sekvenci zde. Analyzovat lze DNA i RNA, krátké sekvence i celé genomy, včetně upřesnění, zda se jedná o kruhovou molekulu [16].

Výstupem je seznam nalezených inverzních repetit definovaných třemi číslicemi oddělenými pomlčkou, délka-smyčka-neshody. Dále je uvedena pozice inverzní repetice v sekvenci a energie potřebná pro vytvoření křížové struktury, která může být užitečná k porovnání pravděpodobnosti tvorby křížové struktury. Program navíc umožňuje vizualizaci odpovídající

křížové struktury [16]. Na obrázku 7 je příklad, jak může vypadat výsledek analýzy krátké nukleotidové sekvence.

Length - Spacer - Mismatches	Position	$\Delta G(cf)$ - $\Delta G(lin)$	Palindrome	Details
9-0-1	2	8.91	GCTTGGGCA TGCCCAAAC	Show details
8-6-0	5	10.82	TGGGCATG CCCAAA CATGCCCA	Hide details

```

1:  A
2:  G
3:  C
4:  T      CC
5:  TGGGCATG C
... |||||
26: ACCCGTAC A
      AA

```

**8-6-0**

Sequence: TGGGCATG  
Spacer: CCCAAA  
Opposite: CATGCCCA  
Position: 5  
Mismatches: 0  
 $\Delta G(cf)$  -  $\Delta G(lin)$ : 10.82  
 $\Delta G(lin)$ : -31.06  
 $\Delta G(cf)$ : -20.24

Obrázek 7: Výsledek analýzy oligonukleotidu pomocí Palindrome analyser

### 2.2.2 Štěpení enzymy

Kombinované štěpení plazmidové DNA S1 nukleázou a restrikční endonukleázou ScaI lze využít k detekci místa vzniku lokální struktury [19].

S1 nukleáza je enzym štěpící ssDNA. Rozpozná smyčku křížové struktury či kvadruplexu, DNA je rozštěpena a ze superhelikální molekuly se stane lineární. Restrikční endonukleáza ScaI poté rozštěpí DNA na dva fragmenty v restrikčním místě. Z délky fragmentů se usuzuje pozice lokální struktury [19].

Restrikční místo enzymu ScaI je znázorněno na obrázku 8.



Obrázek 8: Restrikční místo endonukleázy ScaI [20]

## 2.3 Plazmidy

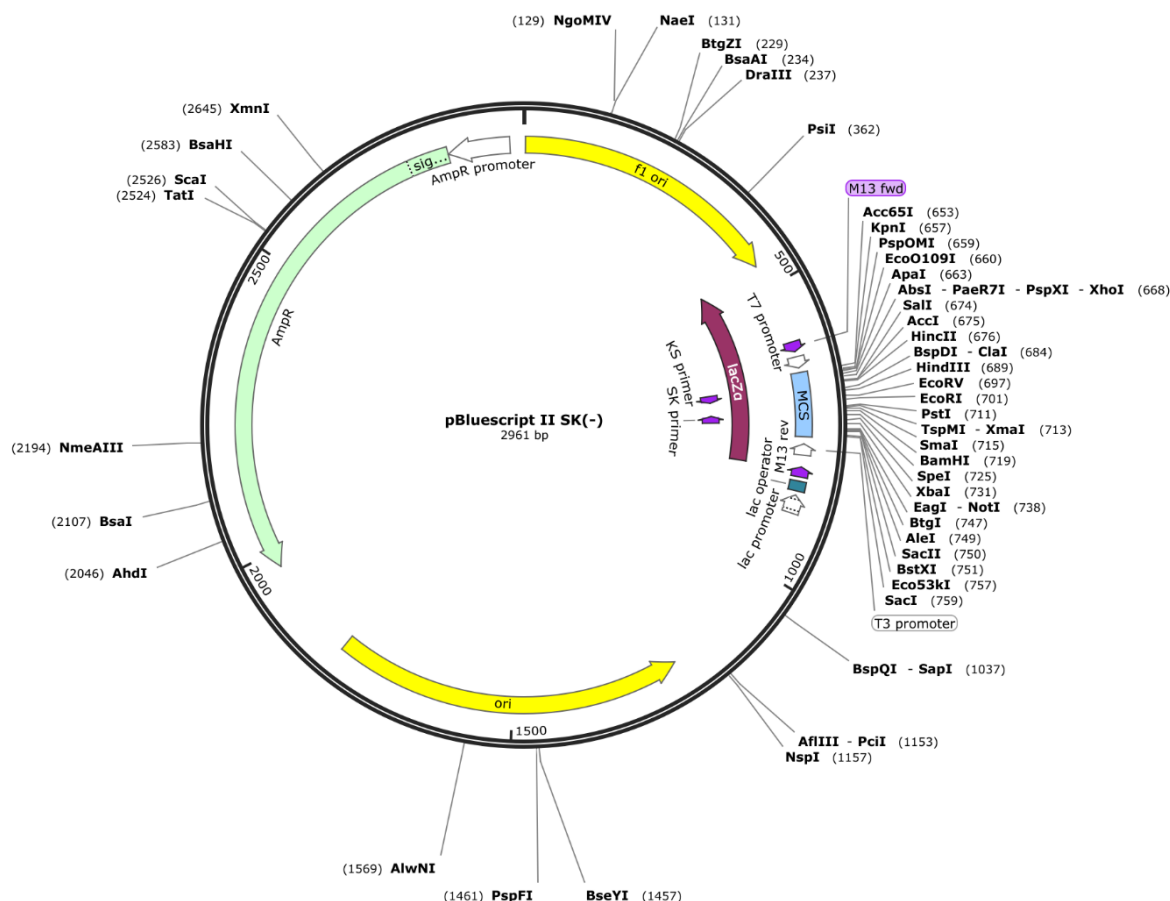
Plazmidy jsou malé molekuly DNA se vyskytující se v buňkách mikroorganismů, zejména bakterií, vzácně u eukaryot. Bakteriální plazmidy jsou obvykle mnohem menší než chromozomy a mohou se přenášet mezi různými bakteriálními buňkami [21]. Co se týče struktury, jedná se zpravidla o kružnicové molekuly dsDNA [3]. Informace, které plazmidy nesou, nejsou pro bakterie nezbytně důležité, ale mohou být velmi užitečné. Je to např. rezistence vůči antibiotikům či virulentní faktory [21] [22]. Replikují se autonomně, obsahují jeden či více počátků replikace, tzv. míst ori [22].

Plazmidy jsou hojně využívány jako klonovací vektory. Tyto vektory vznikly úpravou přirozených plazmidů tak, aby splňovaly specifické požadavky a byly použitelné k různým účelům [23]. Například jsou kratší, aby byly odolnější [24]. Některé plazmidy se v bakteriální buňce vyskytují ve stovkách kopií. Ty jsou vhodné, pokud je třeba získat velké množství DNA pro další práci. Proces vložení DNA do bakteriální buňky se nazývá transformace. I za optimálních podmínek se plazmid transformuje jen do malé části buněk. Důležitou součástí plazmidů používaných ke klonování je marker podporující selektivní růst úspěšně transformovaných bakterií. Nejvíce používané markery jsou geny, které se fenotypově projevují dominantní rezistencí vůči antibiotiku, např. ampicilinu, tetracyklinu nebo chloramfenikolu [23].



Plazmid pBluescript II SK(-) je fagemidový vektor. Byl vytvořen proto, aby umožnil rychle zmapovat inzertované DNA sekvence. Obsahuje 21 restrikčních míst, specifických pro dané enzymy, např. ScaI. Selekční marker tohoto plazmidu je rezistence vůči ampicilinu [25]. Mapa plazmidu se nachází na obrázku 9.

Created with SnapGene®



Obrázek 9: Plazmid pBluescript II SK(-) [26]

## 2.4 Gelová elektroforéza DNA

Elektroforéza je separační technika, jejímž principem je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. DNA nese záporný náboj díky fosfátovým skupinám, její molekuly se budou pohybovat směrem k anodě. Pro separaci nukleových kyselin o velikosti 100 bp až 50 kb (kilobázi, tzn. 50 000 bp) se využívá agarózový gel. Menší molekuly (10 až 1000 bp) bývají separovány v polyakrylamidovém gelu. Využití je zejména pro stanovení velikosti molekuly porovnáním se standardem o známé velikosti. Lze od sebe odlišit také různé konformace DNA. Superhelikální a lineární forma stejné molekulové hmotnosti se pohybuje gelem různou rychlostí [27].

Identifikace separovaných molekul DNA se provádí obarvením vhodným fluorescenčním barvivem. Běžně používaná jsou ethidiumbromid, kyanová barviva SYBR nebo GelRed (alternativa toxického ethidiumbromidu). Po ozáření ultrafialovým (UV) světlem se molekuly DNA o stejné velikosti po separaci zobrazí jako pruhy [27] [28].

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Náplní experimentální části této práce byla *in silico* analýza lokálních struktur, izolace DNA a jejich charakterizace. Byly vybrány plazmidy odvozené od pBluescript vložením sekvence, která tvoří kvadruplex anebo je cílovou sekvencí pro protein p53.

#### 3.1 Materiál

##### 3.1.1 Chemikálie

- Agar (Pliva-Lachema, ČR, Brno)
- Agaróza (Serva, Německo)
- Ampicilin (Biotika, Slovensko)
- Bromfenolová modř (Pliva-Lachema, ČR, Brno)
- Destilovaná voda (FCH VUT, ČR, Brno)
- DNA standard (Malamité, ČR, Moravské Prusy)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina EDTA (Penta, ČR, Chrudim)
- Fluorescenční barvivo GelRed (Biotium, USA)
- Glukóza (Lach-Ner s.r.o., ČR, Neratovice)
- Glycerol (SigmaAldrich, USA)
- Chlorid draselný (Lach-Ner s.r.o., ČR, Neratovice)
- Chlorid hořečnatý (Lachema, ČR, Brno)
- Chlorid sodný (Lachema, ČR, Brno)
- Kvasinkový extrakt (SigmaAldrich, USA)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, ČR, Brno)
- Kyselina octová (Pliva-Lachema, ČR, Brno)
- Síran hořečnatý (Lach-Ner s.r.o., ČR, Neratovice)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Serva, Německo)
- Tryptofan (SigmaAldrich, USA)
- Trypton (SigmaAldrich, USA)
- Xylencyanolová violet' (BDH Chemicals, UK)

##### 3.1.2 Roztoky a pufry

- LB médium (10 g tryptonu, 5 g kvasinkového extraktu, 10 g NaCl, destilovaná H<sub>2</sub>O na objem 1 l)
- SOC médium (20 g tryptofanu, 5 g kvasinkového extraktu, 0,58 g NaCl, 0,19 g KCl, 1,2 g MgSO<sub>4</sub>, 0,95 g MgCl<sub>2</sub>, 3,6 g glukózy, destilovaná H<sub>2</sub>O na objem 1 l)
- 0,1 M roztok CaCl<sub>2</sub>
- 50krát koncentrovaný TAE (242 g Tris-HCl + 18,6 g EDTA + 57,1 ml CH<sub>3</sub>COOH, doplněno na 1 l, před použitím 50krát naředěno)
- 6krát koncentrovaný nanášecí LB pufr (40 % sacharózy, 0,2 % bromfenolové modři, 0,2 % xylencyanolové violeti)
- 1M Tris-HCl (12,1 g Tris -hydroxymethyl-aminotmethanu doplněno na 100 ml destilovanou H<sub>2</sub>O, upraveno HCl na pH 7,8)

### 3.1.3 Pomůcky a přístroje

- Běžné laboratorní sklo, plastové, kovové pomůcky
- Centrifuga chlazená Centurion 5430 R (Eppendorf, Německo, Hamburg)
- Centrifuga MiniSpin®Plus (Eppendorf, Německo, Hamburg)
- Inkubační box Titramax 1000 (Heidolph, Německo, Schwabach)
- Laboratorní váhy Scout Pro (Ohaus, USA, New Jersey)
- Lednice a mrazicí box CRC 340 (Calex, Slovensko, Zlaté Moravce)
- Mikropipety různých objemů (pipet4u, Německo, Nordhausen)
- Mikrovlnná trouba MT1705 B (Professor, Česká republika, Dobříš)
- Spektrofotometr Nanodrop 2000 UV-VIS Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- Transiluminátor ULTRA LUM, INC. (USA, Claremont)
- Třepačka vortex s adaptérem Vortex-Genie 2 (Mo Bio, USA, Carlsbad)
- Zařízení pro elektroforézu (Owl, USA, Portsmouth)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu MP-500P (Major Science, USA, Saratoga)

### 3.1.4 Bakteriální kmen

- *E. coli* STL4 (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)

### 3.1.5 Plazmidy

Plazmidy byly poskytnuty Biofyzikálním ústavem AV ČR, Brno.

pBluescript II SK(-) [25], od něj odvozené viz tabulka 1

Tabulka 1: Seznam plazmidů

Plazmid	Vložená sekvence do HindIII místa	Poznámka
pB-3MYC	TTCCCCACCCTCCCCACCCTCA	3x22bp, sekvence tvořící kvadruplex
pB-htel24	GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAA	25bp, sekvence tvořící kvadruplex
pPGM1 [29]	AGACATGCCTAGACATGCCT	20bp, cílová sekvence pro p53
pPGM2 [30]	AGACATGCCTAGGCATGTCT	20bp, cílová sekvence pro p53
pB-3GC	TGGGCGGGCGGGCGGGT	19bp, sekvence tvořící kvadruplex
pB-6GC	TGGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGGT	19bp, sekvence tvořící kvadruplex
pB-5GA	TGGGGGAGGGGGAGGGGGAGGGGGT	19bp, sekvence tvořící kvadruplex
pB-3GCNK	TGGGCTTTTCGGGCGGGT	19bp, sekvence tvořící kvadruplex
pB-4GCNK	TGGGGCTTTTCGGGCGGGT	19bp, sekvence tvořící kvadruplex
pB-6GCNK	TGGGGGGCTTTTTTCGGGGGGCGGGGGGT	19bp, sekvence tvořící kvadruplex
pB-XT [19]	TTTCATGCCCCGGGCATGCCC	20bp, cílová sekvence pro p53
pB-XG [19]	GGGCATGCCCAAACATGCCC	20bp, cílová sekvence pro p53
pB-XA [19]	TTTCATGCCCCGGGCATGCCC	20bp, cílová sekvence pro p53
pB-TT [19]	GGGCATGTCTGGGCATGCCC	20bp, cílová sekvence pro p53
pB-WC [19]	GGGCACGCCCGGGCATGCCC	20bp, cílová sekvence pro p53
pB-GCG [19]	GCGCATGCCCGGGCATGCCC	20bp, cílová sekvence pro p53

### 3.1.6 Enzymy pro štěpení

- S1 nukleáza (Promega, USA, Madison): roztok S1 nukleázy, pufr pro S1 nukleázu
- Restrikční endonukleáza ScaI (Biolabs, USA, Ipswich): roztok ScaI, pufr pro ScaI, stop pufr



## 3.2 Metody

### 3.2.1 *In silico* analýza výskytu kvadruplexů a křížových struktur

Pro analýzu možného výskytu kvadruplexů či křížových struktur v nukleotidových sekvencích byly použity dvě volně dostupné webové aplikace. První z nich byla QGRS (Quadruplex forming G-Rich Sequences) Mapper, dostupná na adrese <http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/index.php>. Kritéria pro vyhledávání byla: délka sekvence tvořící kvadruplex (QGRS) maximálně 30, velikost G-skupiny minimálně 2, velikost smyčky 0-36. Druhým použitým nástrojem byl Palindrome analyser, dostupný na adrese <http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/index.php>. Vyhledávání probíhalo podle přednastavených kritérií: délka 6-30, mezera 0-10, neshody 0-1.

### 3.2.2 Příprava kompetentních buněk

Ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách bylo přes noc při 37 °C kultivováno 10 ml bakteriálních buněk *E. coli* kmene STBL4 v LB médiu. Poté bylo do 500 ml Erlenmeyerových baňek za stálého míchání přeneseno 0,5 ml této kultury do 50 ml LB média. Následovala inkubace na třepačce 3 hodiny při 37 °C do dosažení optické hustoty 0,5–0,7. Buňky byly dále ve zchlazených 50 ml zkumavkách chlazeny na ledu po dobu 10 minut. Po centrifugaci (10 min, 6000 x g, 4 °C) byl odsát supernatant a pelet buněk rozsuspendován v 10 ml vychlazeného 0,1 M roztoku CaCl<sub>2</sub>. Inkubace na ledu probíhala 25 minut. Po opětovné centrifugaci (10 min, 6000 x g, 4 °C) a odsání supernatantu byl pelet resuspendován v 1 ml roztoku CaCl<sub>2</sub>. Suspenze byla opatrně zamíchána s 0,2 ml sterilního glycerolu a na ledu rozdělena po 100 µl do sterilních eppendorfek. Tyto mikrozkušavky byly uloženy do hlubokomrazicího boxu –80 °C.

### 3.2.3 Transformace plazmidové DNA do kompetentních buněk

Do buněk *E. coli* kmene STBL4 byly transformovány plazmidy. Nejdříve byly z mrazáku (–80 °C) vytaženy kompetentní buňky do krabičky s ledem a ponechány 20 min. Vzápětí byly rozmrazeny také plazmidy. Do eppendorfek bylo rozpipetováno po 50 µl kompetentních buněk a 50 ng plazmidu. Do každé zkumavky bylo crvnknuto. Vzorky byly inkubovány na ledu po dobu 25 minut. Poté byly pro vyvolání teplotního šoku přesunuty na vyhřátý termoblok na 42 °C na 50 s a vráceny zpátky na led na 3 minuty. Ke každému vzorku bylo přidáno 250 µl SOC média. Následovalo třepání při 300 rpm v termobloku při 37 °C 1 hodinu. Na Petriho misky s agarem obsahujícím LB médium a ampicilin (1:1000) bylo vyseto 100 µl kultury a inkubováno 20 hodin při 37 °C.

### 3.2.4 Kultivace bakteriálních buněk

Z Petriho misek byly špičkou pipety odebrány jednotlivé KTJ do falkonek, které obsahovaly 5 ml LB média a ampicilin. V šikmé poloze a s pootevřeným víčkem probíhala inkubace na třepačce (110 rpm) po dobu 16 hodin při 37 °C.

### 3.2.5 Izolace plazmidové DNA

Z bakteriálních buněk, do kterých byly transformovány plazmidy, byla izolována DNA pomocí kitu NucleoSpin® Plasmid. LB kultura buněk *E. coli* byla 2 min centrifugována při otáčkách 11 000 x g a supernatant byl slit. Buněčný pelet byl resuspendován v 250 µl pufru A1 a směs přenesena do eppendorfky. Homogenita směsi byla podpořena vortexováním. Bylo přidáno

250 µl pufru A2 a obsah zkumavky opatrně promíchán opatrným obracením 6krát. Po 5minutové inkubaci při pokojové teplotě proběhlo stejné zamíchání s 300 µl pufru A3.

Vzorky byly centrifugovány 10 minut při 11 000 x g. Do nové eppendorfky s kolonkou obsahující silikonovou membránu bylo odpipetováno 750 µl supernatantu. Následovala centrifugace 1 minutu při otáčkách 11 000 x g a filtrát byl vylit. V dalším kroku byla membrána promývána nejdříve 500 µl pufru AW a poté 2krát 600 µl pufru A4, přičemž vždy následovala 2minutová centrifugace při 11 000 x g a vylití filtrátu. Pro vysušení membrány byly eppendorfky centrifugovány ještě 2 minuty (11 000 x g).

Kolonka se silikonovou membránou byla přesunuta do čisté eppendorfky. Nakonec bylo použito 50 µl elučního pufru AE. Po krátké minutové inkubaci proběhla centrifugace při otáčkách 11 000 x g po dobu 1 minuty. Kolonka se silikonovou membránou byla odstraněna a zkumavka s plazmidovou DNA uchována v mrazáku.

### **3.2.6 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty plazmidové DNA**

Koncentrace a čistota izolované plazmidové DNA byla měřena spektrofotometricky. Měření probíhalo v rozmezí 230 až 320 nm. Eluční pufr AE z kitu pro izolaci NucleoSpin® Plasmid byl použit jako referenční vzorek. Každý vzorek byl před měřením zvortexován a na čočku spektrofotometru byly nanесeny 2 µl roztoku. Z absorbance při 260 nm vyhodnotil přístroj koncentraci DNA a z poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm byla stanovena její čistota.

### **3.2.7 Agarózová gelová elektroforéza plazmidové DNA**

Pro elektroforézu byl připraven 1% agarózový gel z vhodného množství agarózy a 1krát koncentrovaného TAE pufru. Suspenze byla opakovaně rozvařena v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarózy. Po krátkém chladnutí bylo přidáno barvivo GelRed (1 µl na 100 ml) a směs nalita do připraveného elektroforetické vaničky s hřebínkem. Když gel ztuhnul, hřebínek byl opatrně vyjmut.

Během tuhnutí gelu byly připraveny nanášecí vzorky. Do eppendorfek byl odpipetován příslušný objem vzorku plazmidů, aby obsahoval 100 ng DNA, doplněn na 10 µl sterilní destilovanou vodou a přidán 1 µl nanášecího LB pufru. Žebříček byl připraven z 0,5 µl DNA standardu, 4,5 µl sterilní destilované vody a 1 µl nanášecího LB pufru.

Ztuhnutý gel byl přesunut do elektroforetické vany a zalit 1krát koncentrovaným TAE pufrem. Do jednotlivých jamek byly napipetovány připravené vzorky. Elektroforéza probíhala pod napětím 110 V po dobu 80 minut. Nakonec byl gel vyhodnocen a byla pořízena fotografická dokumentace pomocí transiluminátoru pod UV zářením o vlnové délce 305 nm.

### **3.2.8 Štěpení plazmidové DNA**

#### **3.2.8.1 Štěpení S1 nukleázou**

Plazmidová DNA byla štěpena S1 nukleázou. Do sterilních eppendorfek byl napipetován odpovídající objem vzorku plazmidu, aby jeho množství bylo 1 µg. Na 1 µg DNA je třeba použít 4U S1 nukleázy, čemuž odpovídalo 0,05 µl. Směs byla doplněna pufrem pro S1 nukleázu, aby tvořil 10 % celkového objemu. Inkubace probíhala v 37 °C po dobu 2 hodin.

### 3.2.8.2 Štěpení restrikční endonukleázou ScaI

Štěpení restrikční endonukleázou bylo provedeno s 1 µg DNA, 1 µl ScaI, 5 µl pufru pro ScaI a doplněno sterilní destilovanou vodou na objem 50 µl. Vzorky byly ponechány v inkubátoru 40 minut při 37 °C. Nakonec bylo přidáno 10 µl stop pufru.

### 3.2.8.3 Kombinované štěpení S1/ScaI

Plazmidy byly štěpeny nejdříve S1 nukleázou a poté restrikční endonukleázou ScaI. Mezi těmito štěpeními měly být vzorky přečištěny, a to pomocí kitu QIAquick® PCR Purification Kit, srážením ethanolem nebo pomocí magnetických částic.

### 3.2.9 Agarózová gelová elektroforéza produktů štěpení

Elektroforéza produktů štěpení byla provedena stejně jako v kapitole 3.2.7. Na gel byly nanášeny vzorky původní neštěpené DNA a vedle produkty štěpení oběma enzymy.

## 3.3 Výsledky a diskuze

### 3.3.1 In silico analýza výskytu kvadruplexů a křížových struktur

#### 3.3.1.1 In silico analýza oligonukleotidů

Na přítomnost kvadruplexů a inverzních repetice bylo analyzováno 32 nukleotidových sekvencí o délce v rozmezí 19–57 bp, o kterých je již známo, že dané struktury tvoří anebo že jsou cílovými sekvencemi pro protein p53. K tomu byly použity volně dostupné webové aplikace, QGRS Mapper a Palindrome analyser, jak je popsáno v kapitole 3.2.1.

Ve 26 analyzovaných sekvencích byla nalezena jedna z hledaných struktur, v 6 sekvencích ani jedna. Žádná ze sekvencí neobsahovala oba typy struktur. Kvadruplex byl nalezen ve 13 sekvencích, z toho v 1 sekvenci dva kvadruplexy. Hodnota G-skóre se pohybovala v rozmezí 15–105. Nejvyšší hodnota byla pro sekvenci 6GC, výsledek je na obrázku 10. Mezi sekvence s nejnižším G-skóre patřila NK4G, výsledek ukazuje obrázek 11.

V jiných 13 sekvencích byla nalezena inverzní repetice, která může tvořit křížovou strukturu. Z toho 6 sekvencí obsahovalo dvě inverzní repetice s danými parametry. Jsou charakterizovány číslicemi ve formě délka repetice – mezera – počet neshod. Inverzní repetice sekvence XG1 včetně predikovaných struktur jsou na obrázku 13.

Výsledky jsou shrnuty v tabulce na obrázku 12. Lze si povšimnout, že kvadruplexy byly nalezeny v sekvencích obsahujících značný počet guaninu, inverzní repetice naopak v sekvencích s vyšším výskytem adeninu a thyminu.

S některými z těchto sekvencí se pracovalo dále. Byly inzertovány do plazmidu pBluescript.

Position	Length	QGRS	G-Score
3	27	GGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGG	105

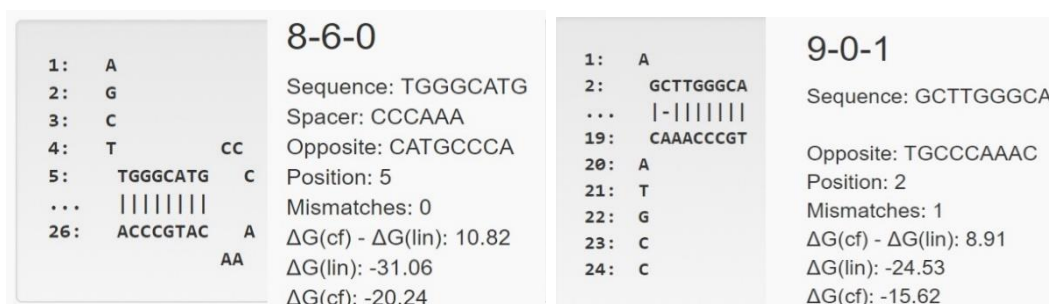
Obrázek 10: Analýza sekvence 6GC pomocí QGRS Mapper

Position	Length	QGRS	G-Score
3	17	GGGGCTTTTCGGGGCGG	15

Obrázek 11: Analýza sekvence NK4G pomocí QGRS Mapper

Název	Sekvence	Kvadruplex	G-skóre	Inverzní repetice	
3GC	TTGGGCGGGCGGGCGGGTT	1	42	-	
4GC	TTGGGGCGGGCGGGCGGGTT	1	63	-	
5GC	TTGGGGCGGGCGGGCGGGG GTT	1	84	-	
6GC	TTGGGGCGGGCGGGCGGGGCG GGGGTT	1	105	-	
5GA	TTGGGGAGGGGGAGGGGAGGG GTT	1	84	-	
5GT	TTGGGGGTGGGGGTGGGGGTGGG GTT	1	84	-	
PKcMYC	TGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGA AGG	1	41	-	
NK3G	TTGGGCTTTTCGGGCGGGTT	-	-	-	
NK4G	TTGGGGCTTTTCGGGCGGGTT	1	15	-	
NK5G	TTGGGGCTTTTCGGGGCGGGG TT	1	21	-	
NK6G	TTGGGGGCTTTTTTCGGGGGCGG GGGGTT	1	34	-	
mycPU21 1	AGCTTGAGGGTGGGGAGGGTGGGG AAA	1	41	-	
mycPU21 2	AGCTTTTCCCCACCCTCCCCACCCTC A	-	-	-	
hTel24 1	AGCTTGGGTAGGGTAGGGTAGG GTAA	1	42	-	
hTel24 2	AGCTTTAACCTAACCTAACCTA ACCCA	-	-	-	
hTel51 1	AGCTTGGGTAGGGTAGGGTAGG GTTAGGGTAGGGTAGGGTAGGG TTAGGGA	2	42, 42	-	
hTel51 2	AGCTTCCCTAACCTAACCTAACCC CTAACCTAACCTAACCTAACCC TAACCCA	-	-	-	
BRCA1con(GADD45G)-A	CCTGGTAACACCCCAACAAAAGCGG CAGATTC	-	-	-	
p53con(pPGM3)-A	CCCTCGAGGCATGCCTAGGCATGCC TCCGCC	-	-	7-0-1	11-0-0
polyA31	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAA	-	-	-	-
XT 1	AGCTTTTTCATGCCCCGGGCATGCC A	-	-	7-0-0	-
XT 2	AGCTTGGGCATGCCCCGGGCATGAAA A	-	-	7-0-0	-
XA 1	AGCTTAAACATGCCCCGGGCATGCC A	-	-	7-0-0	-
XA 2	AGCTTGGGCATGCCCCGGGCATGTTT A	-	-	7-0-0	-
XG 1	AGCTTGGGCATGCCCAAACATGCC A	-	-	8-6-0	9-0-1
XG 2	AGCTTGGGCATGTTTGGGCATGCC A	-	-	6-0-0	8-6-0
XG TT 1	AGCTTGGGCATGTCTGGGCATGCC A	-	-	6-0-0	10-2-1
XG TT 2	AGCTTGGGCATGCCCAGACATGCC A	-	-	6-0-0	10-2-1
XG WC 1	AGCTTGGGCACGCCCGGGCATGCC A	-	-	11-0-1	-
XG WC 2	AGCTTGGGCATGCCCGGGCGTGCC A	-	-	11-0-1	-
XG GCG 1	AGCTTGCGCATGCCCGGGCATGCC A	-	-	6-0-1	11-0-1
XG GCG 2	AGCTTGGGCATGCCCGGGCATGCGC A	-	-	11-0-1	-

Obrázek 12: In silico analýza přítomnosti kvadruplexů (pomocí QGRS Mapper) a inverzních repetic (pomocí Palindrome analyser) v oligonukleotidových sekvencích



Obrázek 13: Analýza sekvence XG I pomocí Palindrome analyser

### 3.3.1.2 In silico analýza inzertovaných sekvencí

Pro přehlednost jsou do tabulky 2 shrnuty výsledky pouze pro sekvence, které byly dále používány. V sekvencích, které měly tvořit kvadruplex, byl opravdu nalezen, kromě 3MYC a 3GCNK. V cílových sekvencích pro p53 byly nalezeny inverzní repetice.

Tabulka 2: In silico analýza přítomnosti kvadruplexů (pomocí QGRS Mapper) a inverzních repetit (pomocí Palindrome analyser) v inzertovaných sekvencích

Plazmid	Vložená sekvence	G-skóre kvadruplexu	Inverzní repetice	$\Delta G(\text{cf}) - \Delta G(\text{lin})$
pB-3MYC	TTCCCCACCCTCCCCACCCTCA			
pB-htel24	GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAA	42		
pPGM1	AGACATGCCTAGACATGCCT		7-0-1	0,19
pPGM2	AGACATGCCTAGGCATGTCT		10-0-0	2,33
pB-3GC	TGGGCGGGCGGGCGGGT	42		
pB-6GC	TGGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGGT	105		
pB-5GA	TGGGGGAGGGGGAGGGGGAGGGGGT	84		
pB-3GCNK	TGGGCTTTTCGGGCGGGT			
pB-4GCNK	TGGGGCTTTTCGGGGCGGGT	15		
pB-6GCNK	TGGGGGGCTTTTTTCGGGGGGCGGGGGGT	34		
pB-XT	TTTCATGCCCCGGGCATGCCC		7-0-0	4,13
pB-XG	GGGCATGCCCAAACATGCCC		7-6-0	10,82
pB-XA	TTTCATGCCCCGGGCATGCCC		7-0-0	4,13
pB-TT	GGGCATGTCTGGGCATGCCC		9-2-1	11,09
pB-WC	GGGCACGCCCCGGGCATGCCC		10-0-1	10,08
pB-GCG	GCGCATGCCCGGGCATGCCC		10-0-1	12,22

### 3.3.1.3 In silico analýza plazmidů

Způsobem popsáním v kapitole 3.2.1 bylo analyzováno 17 plazmidů. Tabulka 3 ukazuje počty nalezených kvadruplexů a inverzních repetit. Na obrázku 14 je výsledek analýzy plazmidu pBluescript v programu QGRS Mapper. Kvadruplex v tomto plazmidu může tvořit 10 sekvencí. Těchto 10 sekvencí bylo nalezeno i u všech ostatních plazmidů, odvozených od pBluescript, v souladu s očekáváním.

V 7 plazmidech bylo nalezeno 11 kvadruplexů. Jednalo se o plazmidy pB-htel24, pB-3GC, pB-6GC, pB-5GA, pB-3GCNK, pB-4GCNK, pB-6GCNK, do nichž byla vložena sekvence, která by kvadruplex měla tvořit. Nalezené QGRS (obrázek 15) v plazmidech svými G-skóre odpovídaly analýze vložených sekvencí (tabulka 2). U plazmidu pB-6GC je G-skóre 105, což

je nejvyšší možná hodnota. To znamená, že kvadruplexová struktura je velmi stabilní. Nejnižší G-skóre, hodnotu 6, měl plazmid pB-3GCNK, případná kvadruplexová struktura nebude příliš stabilní. Ve vložené sekvenci 3GCNK ani kvadruplex nalezen nebyl.

*Tabulka 3: Počet nalezených potenciálních kvadruplexů a inverzních repetit v plazmidech, nastavení programů viz kapitola 3.2.1*

Plazmid	Délka sekvence	Kvadruplexy	Inverzní repetice
pBluescript	2961	10	96
pB-3MYC	3089	10	96
pB-htel24	3023	11	94
pPGM1	2987	10	97
pPGM2	2987	10	97
pB-3GC	2971	11	95
pB-6GC	2983	11	94
pB-5GA	2979	11	94
pB-3GCNK	2971	11	95
pB-4GCNK	2975	11	96
pB-6GCNK	2983	11	95
pB-XT	2987	10	95
pB-XG	2987	10	96
pB-XA	2987	10	95
pB-TT	2987	10	96
pB-WC	2987	10	95
pB-GCG	2987	10	96

Plazmid pB-3MYC obsahuje 3krát vloženou sekvenci tvořící kvadruplex, ovšem QGRS Mapper zde žádnou sekvenci podezřelou z tvorby kvadruplexu nenalezl. To bylo způsobeno tím, že vložená sekvence neobsahovala žádný guanin, ale cytosin, a kvadruplex bude tvořen komplementárním řetězcem DNA. Pro potvrzení byla analyzována reverzní sekvence k inzertované sekvenci, která ukazuje kvadruplex s G-skóre 41, viz obrázek 16. Odpovídá tak oligonukleotidu mycPU21 1 na obrázku 12.

Inverzních repetit bylo v plazmidu pBluescript nalezeno 96, v ostatních se počet pohyboval mezi 94 a 97. Nejdelší inverzní repetice byla tvořena 16 nukleotidy.

Pozice	Délka	QGRS	G-skóre
32	14	<u>GGCGGGTGTGGTGG</u>	19
489	21	<u>GGGAAGGGCGATCGGTGCGGG</u>	20
539	30	<u>GGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG</u>	11
653	29	<u>GGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGG</u>	15
1004	12	<u>GGGGAGAGGC GG</u>	18
1067	23	<u>GGTCGTTCTGGCTGCGGCGAGCGG</u>	19
1106	30	<u>GGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGG</u>	7
1579	28	<u>GGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGG</u>	9
1627	29	<u>GGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAAGG</u>	11
1725	29	<u>GGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGG</u>	6

Obrázek 14: Výsledek analýzy plazmidu pBluescript v aplikaci QGRS Mapper

	Pozice	Délka	QGRS	G-skóre
pB-htel24	695	21	<u>GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG</u>	42
pB-3GC	695	15	<u>GGGCGGGCGGGCGGG</u>	42
pB-6GC	695	27	<u>GGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGG</u>	105
pB-5GA	695	23	<u>GGGGGAGGGGAGGGGAGGGGG</u>	84
pB-3GCNK	703	28	<u>GGGCGGGTTAATTCCTGCAGCCC GGGGG</u>	6
pB-4GCNK	697	15	<u>GGCTTTTCGGGGCGG</u>	15
pB-6GCNK	695	27	<u>GGGGGGCTTTTTTCGGGGGGCGGGGGG</u>	34

Obrázek 15: Potenciální kvadruplexy nalezené ve vložených sekvencích plazmidů pB-htel24, pB-3GC, pB-6GC, pB-5GA, pB-3GCNK, pB-4GCNK, pB-6GCNK

Pozice	Délka	QGRS	G-skóre
4	16	<u>GGGTGGGGAGGGTGGG</u>	41

Obrázek 16: Analýza reverzní inzertované sekvence plazmidu pB-3MYC

### 3.3.2 Izolace plazmidové DNA

Plazmidová DNA byla izolována z bakteriálních buněk, viz kapitola 3.2.5. Neprodleně byla spektrofotometricky změřena její koncentrace a čistota, dle postupu v kapitole 3.2.6. Přítomnost DNA byla ověřena elektroforézou v agarózovém gelu, postup v kapitole 3.2.7.

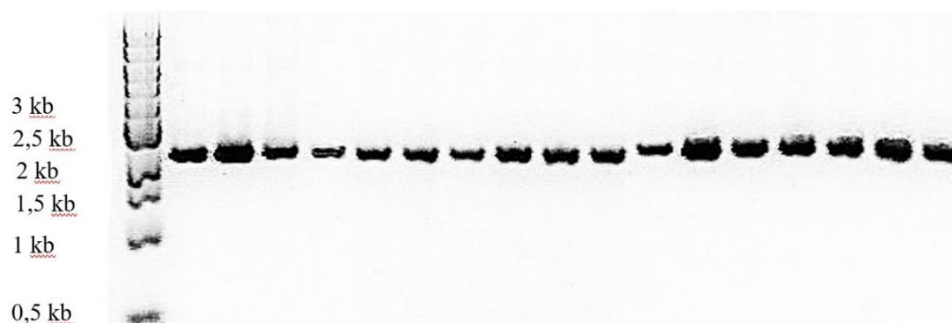
Naměřená koncentrace a čistota izolovaných plazmidů je uvedena v tabulce 4. Každá hodnota byla změřena třikrát a výsledky byly zprůměrovány. Hodnoty koncentrací se pohybovaly v rozmezí 43,0 až 162,0 ng/μl. Široké rozpětí koncentrací mohlo být způsobeno tím, že v odebraných koloniích pro izolaci nemuselo být stejné množství buněk. Dalším důvodem mohla být rozdílná viabilita jednotlivých kultur. DNA bývá považována za čistou, pokud se poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) nachází v rozmezí 1,8 až 2. Hodnoty, jak je patrné z tabulky 4, se pohybovaly v rozmezí 1,81 až 1,87. Izolovaná DNA byla dostatečně čistá.

Agarózovou gelovou elektroforézou byla detekována DNA ve všech vzorcích. Obraz gelu je níže na obrázku 17. Superhelikální DNA se pohybuje gelem pomaleji než lineární. Proto

velikost molekul vzorků je ve skutečnosti vyšší než molekuly lineárního žebříčku, která doputovala do stejné vzdálenosti.

Tabulka 4: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty plazmidové DNA

Plazmid	Koncentrace ng/μl	Čistota $A_{260}/A_{280}$
pBluescript	101,1	1,81
pB-3MYC	162,0	1,87
pB-htel24	74,1	1,82
pPGM1	139,9	1,86
pPGM2	134,6	1,86
pB-3GC	43,0	1,88
pB-6GC	66,7	1,86
pB-5GA	75,7	1,83
pB-3GCNK	105,7	1,86
pB-4GCNK	97,5	1,87
pB-6GCNK	72,0	1,85
pB-XT	97,1	1,84
pB-XG	68,1	1,81
pB-XA	122,2	1,85
pB-TT	89,8	1,85
pB-WC	127,5	1,86
pB-GCG	128,0	1,86



Obrázek 17: Agarózová gelová elektroforéza izolovaných plazmidů. Zleva: žebříček, pPGM1, pPGM2, pB-3MYC, pBluescript, pB-3GC, pB-6GC, pB-5GA, pB-3GCNK, pB-4GCNK, pB-6GCNK, pB-hTel24, pB-XT, pB-XG, pB-XA, pB-TT, pB-WC, pB-GCG

### 3.3.3 Štěpení plazmidové DNA

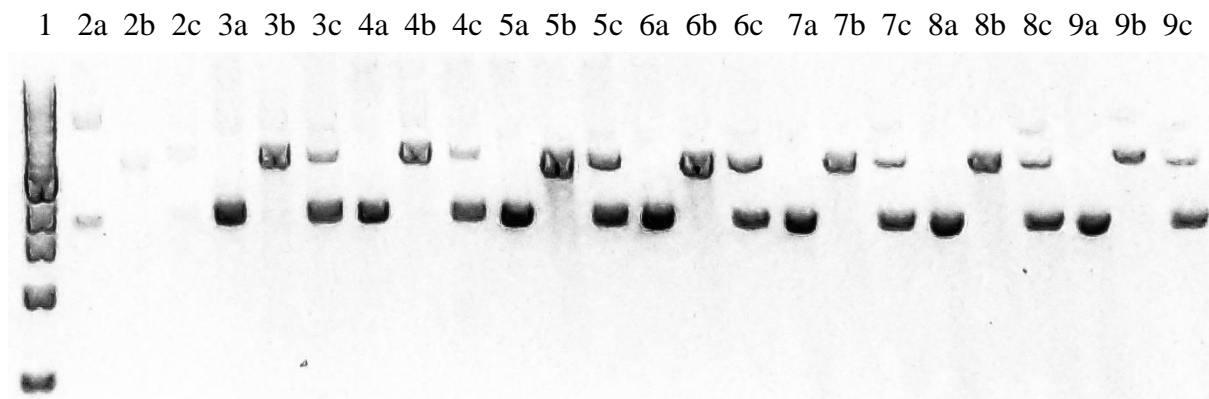
Plazmidová DNA byla štěpena dvěma enzymy, S1 nukleázou a restrikční endonukleázou ScaI. Postup je popsán v kapitole 3.2.8. Produkty štěpení byly zobrazeny pomocí elektroforézy v agarózovém gelu, viz obrázek 18, obrázek 19, obrázek 20. Na gel byly naneseny vždy tři vzorky daného plazmidu, před štěpením, po štěpení S1 nukleázou a po štěpení restrikční endonukleázou ScaI.

Enzym S1 nukleáza specificky štěpí ssDNA. U všech plazmidů se ze superhelikální DNA stala lineární. K tomu mohlo dojít ve smyčkách kvadruplexů či křížových struktur.

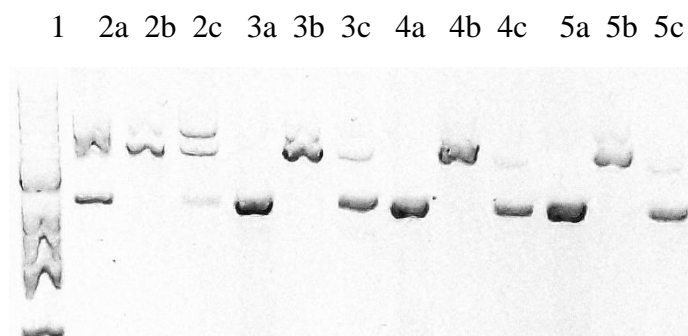
Štěpení restrikční endonukleázou ScaI mělo rovněž za výsledek linearizaci molekul DNA, protože všechny zkoumané plazmidy obsahují restrikční místo ScaI. Na obrázcích 18 – 20 jsou



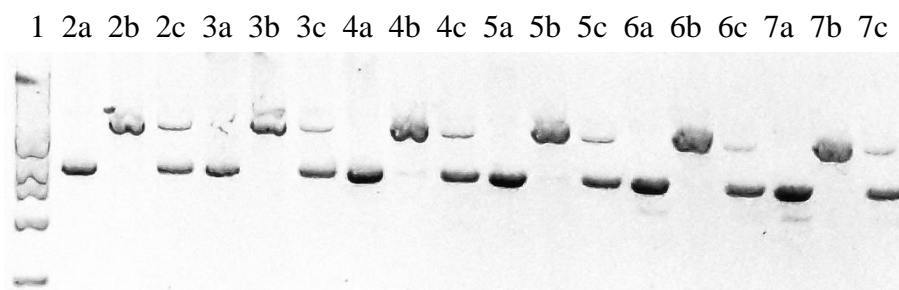
na gelu patrné dva pruhy. Nižší a výraznější pruh odpovídá nerozštěpené DNA v původní superhelikální formě, slabší pruh DNA, která se rozštěpila. Pravděpodobně nebyly pro štěpení vytvořeny ideální podmínky, proto byla rozštěpena jen menší část molekul.



Obrázek 18: Agarózová gelová elektroforéza DNA před a po štěpení; a) před štěpením, b) po štěpení S1 nukleázou, c) po štěpení restriční endonukleázou ScaI; Pořadí vzorků: 1) žebříček, 2) pBluescript, 3) pB-3MYC, 4) pB-htel24, 5) pPGM1, 6) pPGM2, 7) pB-3GCNK, 8) pB-4GCNK, 9) pB-6GCNK



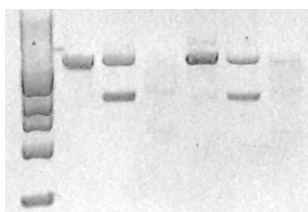
Obrázek 19: Agarózová gelová elektroforéza DNA před a po štěpení; a) před štěpením, b) po štěpení S1 nukleázou, c) po štěpení restriční endonukleázou ScaI; Pořadí vzorků: 1) žebříček, 2) pBluescript, 3) pB-3GC, 4) pB-6GC, 5) pB-5GA



Obrázek 20: Agarózová gelová elektroforéza DNA před a po štěpení; a) před štěpením, b) po štěpení S1 nukleázou, c) po štěpení restriční endonukleázou ScaI; Pořadí vzorků: 1) žebříček, 2) pB-XT, 3) pB-XG, 4) pB-XA, 5) pB-TT, 6) pB-WC, 7) pB-GCG

Štěpení oběma enzymy po sobě neproběhlo úspěšně. Chyba byla pravděpodobně v přečištění mezi jednotlivými štěpeními. Byly vyzkoušeny tři metody: pomocí kitu QIAquick® PCR Purification Kit, srážení ethanolem a pomocí magnetických částic. Při přečištění DNA došlo k jejím ztrátám, a tak bylo detekováno jen malé množství DNA, viz obrázek 21. Proužky DNA byly velmi slabé, a tak nebylo možno určit velikosti fragmentů po štěpení oběma enzymy, které slouží k identifikaci místa vzniku lokální struktury [19].

1 2a 2b 2c 3a 3b 3c



*Obrázek 21: Agarózová gelová elektroforéza produktů štěpení: a) po štěpení S1 nukleázou, b) po štěpení restrikční endonukleázou ScaI, c) po štěpení oběma enzymy; Pořadí vzorků: 1) žebříček, 2) pB-pGM1, 3) pB-PMG2*

## 4 ZÁVĚR

V experimentální části byla zkoumána přítomnost kvadruplexů a křížových struktur v plazmidu pBluescript II SK(-) a 16 plazmidech z něj vytvořených vložením oligonukleotidové sekvence.

Jedna část analýzy byla provedena *in silico* pomocí webových aplikací QGRS Mapper a Palindrome analyser. V plazmidech pB-3MYC, pB-htel24, pB-3GC, pB-6GC, pB-5GA, pB-3GCNK, pB-4GCNK, pB-6GCNK bylo ověřeno, že inzertovaná sekvence může tvořit kvadruplex. Nejvyšší pravděpodobnost a stabilita kvadruplexové struktury byla stanovena pro plazmid pB-6GC, nejnižší pro pB-3GCNK. Inverzních repetice bylo v plazmidech nalezeno 94 až 97, přičemž nejdelší se skládala z 16 nukleotidů. Ve vložených sekvencích cílových pro protein p53 byly nalezeny inverzní repetice.

V další části byly plazmidy izolované z buněk *E. coli* podrobeny štěpení enzymy S1 nukleázou a restrikční endonukleázou ScaI. Štěpením jednotlivými enzymy bylo dosaženo linearizace molekul DNA, čímž byla potvrzena přítomnost kvadruplexů či křížových struktur. Z kombinovaného štěpení S1/ScaI nebyly získány přesvědčivé výsledky, protože bez přečištění enzym ScaI danou DNA neštěpil a při přečištění došlo ke značným ztrátám DNA.

Navázáním na tuto práci by mohlo být přečištění optimalizováno, provedeno S1/ScaI štěpení a popsáno umístění lokálních struktur. Dále by pak plazmidy byly analyzovány zobrazením pomocí mikroskopie atomárních sil.

## 5 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MURRAY, Robert K. *Harperova biochemie*. 4. čes. vyd. Jinočany: Nakladatelství a vydavatelství H + H, 2002, 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
- [2] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 1996, 191 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [3] *Úvod do molekulární biologie. První díl, Vstup do molekulární biologie, molekulární biologie prokaryotické buňky*. 4. inovované vyd. Brno: Rosypal, 2006, 289 s. : il. ISBN 80-902562-5-2.
- [4] FERENČÍK, Miroslav. *Biochémiá*. Bratislava: Slovak Academic Press, 2000, 924 s. ISBN 80-88908-57-4.
- [5] WATSON, J. D. a F. H. C. CRICK. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* [online]. 1953, **171**(4356), 737-738 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1038/171737a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/171737a0>
- [6] Forms of DNA. In: *Biological exceptions* [online]. b.r. [cit. 2019-05-03]. Dostupné z: <http://biologicalexceptions.blogspot.com/2013/10/dna-is-as-easy-as-b-z.html>
- [7] Nukleové kyseliny. *Moje Chemie* [online]. b.r. [cit. 2019-05-03]. Dostupné z: [http://www.mojechemie.cz/Biochemie:Nukleov%C3%A9\\_kyseliny#Terci.C3.A1rn.C3.AD\\_a\\_kvart.C3.A9rn.C3.AD\\_struktura](http://www.mojechemie.cz/Biochemie:Nukleov%C3%A9_kyseliny#Terci.C3.A1rn.C3.AD_a_kvart.C3.A9rn.C3.AD_struktura)
- [8] JOHNSON, R. E., L. PRAKASH a S. PRAKASH. Biochemical evidence for the requirement of Hoogsteen base pairing for replication by human DNA polymerase . *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2005, **102**(30), 10466-10471 [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.1073/pnas.0503859102. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0503859102>
- [9] BRÁZDA, Václav a Jan COUFAL. Recognition of Local DNA Structures by p53 Protein. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(2) [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.3390/ijms18020375. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/2/375>
- [10] GELLERT, M., M.n. LIPSETT a D.r. DAVIES. Helix formation by guanylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1962, **48**, 2013-2018 [cit. 2019-05-03]. ISSN 00278424.
- [11] BURGE, Sarah, Gary N. PARKINSON, Pascale HAZEL, Alan K. TODD a Stephen NEIDLE. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Research* [online]. 2006, **34**(19), 5402-5415 [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.1093/nar/gkl655. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkl655>
- [12] KIKIN, O., L. D'ANTONIO a P. BAGGA. QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research* [online]. 2006, **34**(), 676-682 [cit. 2019-03-28]. DOI: 10.1093/nar/gkl253. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkl253>

- [13] STEGLE, Oliver, Linda PAYET, Jean-Louis MERGNY, David J. C. MACKAY a Julian Leon HUPPERT. Predicting and understanding the stability of G-quadruplexes. *Bioinformatics* [online]. 2009, **25**(12), 374-1382 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp210. ISSN 1460-2059. Dostupné z: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btp210>
- [14] G-quadruplex. In: *DNA Barcoding* [online]. b.r. [cit. 2019-05-03]. Dostupné z: <http://dna-barcoding.blogspot.com/2014/12/four-stranded-dna.html>
- [15] Hairpins and cruciforms. In: *SlidePlayer* [online]. b.r. [cit. 2019-05-04]. Dostupné z: [https://images.slideplayer.com/36/10664077/slides/slide\\_33.jpg](https://images.slideplayer.com/36/10664077/slides/slide_33.jpg)
- [16] BRÁZDA, Václav, Jan KOLOMAZNÍK, Jiří LÝSEK, Lucia HÁRONÍKOVÁ, Jan COUFAL a Jiří ŠTASTNÝ. Palindrome analyser – A new web-based server for predicting and evaluating inverted repeats in nucleotide sequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2016, **478**(4), 1739-1745 [cit. 2019-03-28]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.015. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X16314620>
- [17] BRÁZDA, Václav et al. Strong preference of BRCA1 protein to topologically constrained non-B DNA structures. *BMC Molecular Biology* [online]. 2016, **17**(1) [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.1186/s12867-016-0068-6. ISSN 1471-2199. Dostupné z: <http://bmcmolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12867-016-0068-6>
- [18] HÁRONÍKOVÁ, Lucia et al. IFI16 Preferentially Binds to DNA with Quadruplex Structure and Enhances DNA Quadruplex Formation. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(6) [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.1371/journal.pone.0157156. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0157156>
- [19] BRÁZDA, Václav et al. The structure formed by inverted repeats in p53 response elements determines the transactivation activity of p53 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. Elsevier Inc, 2017, **483**(1), 516-521 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.12.113. ISSN 0006-291X.
- [20] ScaI. In: *Nzytech* [online]. b.r. [cit. 2019-04-05]. Dostupné z: <https://www.nzytech.com/products-services/molecular-biology/restriction-enzymes/conventional/mb301/>
- [21] CLARK, David P., Nanette J. PAZDERNIK a Michelle R. MCGEHEE. Plasmids. *Molecular Biology* [online]. Elsevier, 2019, s. 712-748 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1016/B978-0-12-813288-3.00023-9. ISBN 9780128132883. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128132883000239>
- [22] Bakterie a prokaryota obecně. *Genetika - Biologie* [online]. 2010-2014 [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/prokaryota>
- [23] DEMNEROVÁ, Kateřina. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 179 s. ISBN 80-7080-415-7.
- [24] *Molecular Biology and Biotechnology*. 4th Ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000, 563 s. ISBN 0-85404-606-2.

- [25] ALTING-MEES, M.A. a J.M. SHORT. PBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Research* [online]. 1989, **17**(22), 9494-9494 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1093/nar/17.22.9494. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/17.22.9494>
- [26] PBluescript II SK(-). In: *SnapGene* [online]. b.r. [cit. 2019-05-02]. Dostupné z: [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic\\_cloning\\_vectors&plasmid=pBluescript\\_II\\_SK\(-\)](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=pBluescript_II_SK(-))
- [27] ŠMARDÁ, Jan et al. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [28] GelRed® Nucleic Acid Gel Stain. *Biotium* [online]. b.r. [cit. 2019-05-04]. Dostupné z: <https://biotium.com/product/gelred-nucleic-acid-gel-stain/>
- [29] PALEČEK, Emil et al. Tumor suppressor protein p53 binds preferentially to supercoiled DNA. *Oncogene* [online]. 1997, **15**(18), 2201-2209 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1038/sj.onc.1201398. ISSN 0950-9232.
- [30] PALEČEK, Emil et al. Enhancement of p53 sequence-specific binding by DNA supercoiling. *Oncogene* [online]. Nature Publishing Group, 2004, **23**(12), 2119 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1038/sj.onc.1207324. ISSN 0950-9232.

## **6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

A – adenin

AV ČR – Akademie věd České republiky

bp – pár bází

C – cytosin

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dsDNA – dvouřetězcová DNA

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

G – guanin

kb – kilobáze

QGRS – sekvence tvořící kvadrupelex bohatá na guanin

RNA – ribonukleová kyselina

ssDNA – jednořetězcová DNA

T – thymin

TAE – Tris-acetát-EDTA

UV – ultrafialové (záření)